(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0026275
(43) 공개일자 2014년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 5/08 (2006.01) *A61K 38/06* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0098938
(22) 출원일자 2013년08월21일
심사청구일자 2013년08월21일
(30) 우선권주장
1020120092752 2012년08월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
최영준
경상남도 통영시 미수해안로 36, 103동 805호(미수동, 현대아파트)
(74) 대리인
위병갑

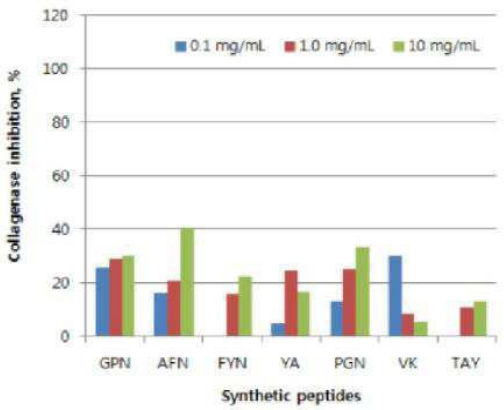
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **콜라게나제의 활성 저해 효과를 갖는 굴 가수분해물 유래 신규 펩타이드 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 콜라게나제의 활성을 저해하는 효과를 가진 굴 가수분해물 유래 신규 펩타이드, 이를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 및 이를 유효성분으로 포함하는 주름 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 펩타이드는 콜라게나제 활성을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 콜라게나제 매개 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 주름 개선에 유용하게 사용할 수 있는바, 본 발명의 신규 펩타이드는 의약품 산업과 식품산업 및 화장품 산업과 같은 다양한 분야의 소재로서 폭넓게 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 신규 펩타이드는 천연물로부터 유래된 펩타이드의 아미노산 서열에 바탕을 두고 있으며, 세포독성 없이 안정성을 가지므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

대 표 도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20120032
부처명	농촌진흥청
연구사업명	기술사업화지원사업
연구과제명	굴 생물전환을 통한 고혈압 활성 분획물의 효능 검증
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교
연구기간	2011.11.03 ~ 2014.11.02

특허청구의 범위

청구항 1

GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 콜라게나제 활성 억제용 펩타이드.

청구항 2

GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 콜라게나제 매개 질환은 골다공증, 전이성 골수암, 각막 궤양, 치주질환, 염증성 관절 질환, 피부 염증성 질환, 창상 및 화상으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 질환인 것을 특징으로 하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 펩타이드는 상기 조성물에 대해 0.1ug/ml~5000mg/ml의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 7

GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 화장료 조성물을 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 제형화되는 것을 특징으로 하는 주름 개선용 화장료 조성물.

청구항 9

GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 재생용 기능성 화장료 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 콜라게나제의 활성을 저해하는 효과를 가진 굴 가수분해물 유래 신규 펩타이드, 이를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 이를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 및 이를 유효성분으로 포함하는 주름 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] MMP(Matrix metalloproteinase)는 세포외 기질(Extracellular matrix, ECM)과 기저막 분해에 관여하는 효소군으로 구조와 기능적 특성에 따라 간질성 콜라게나제(interstitial collagenase), 스트로멜리신(stromelysin), 젤라티나제 (gelatinase), 막-타입 MMP(membrane-type MMP, MT-MMP) 등 네 개의 아과(subfamily)로 나누어진다. MMP들은 포유류, 조류, 양서류, 식물류 및 선충 등 다양한 종에서 현재까지 20종류 이상이 알려져 있다. 또한 MMP들은 기질 특이성에서는 서로 차이가 나지만 구조적, 기능적 유사성을 가지고 있다. 따라서 모든 MMP들의 명칭은 일반적으로 번호를 붙여서 부르고 있다. 즉, 콜라게나제-1, 2, 3은 MMP-1, 8, 13으로, 젤라티나제-A, B는 MMP-2, 9로, 스트로멜리신-1, 2, 3은 MMP-3, 10, 11로, 메탈로엘라스타제(metalloelastase)는 MMP-12로, 마트릴리신(matrilysin)은 MMP-7로, 막-타입 MMP(MT-MMPs)는 MMP-14, 15, 16, 17, 24로, 에나멜리신(enamelysin)은 MMP-20, MMP-19, MMP-23 등으로 부른다. 이 효소들은 각각 해당되는 기질, 즉 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌(laminin), 프로테오글리칸, 엔탁틴, 엘라스틴 등의 단백질들을 분해할 수 있다. MMP는 활성 중심부에 아연을 가지는 금속단백분해효소로 생체 내에서 비활성 전구체(zymogen) 형태로 분비된다. 효소활성을 가지기 위해서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단부위가 절단되어야 하며, 활성화된 MMP는 2-마크로글로불린(2-macroglobulin)이나 TIMPs(Tissue inhibitors of metalloproteinase)와 같은 저해제에 의해 활성이 조절된다.

[0003] 각각의 MMP 는 특이적인 아미노산 서열을 포함하며, 특이적인 세포 및 조직 분포를 나타내며, 표적 기질 단백질의 특이적인 서브세트를 가수분해한다. 일반적으로, MMP 의 정상적인 기질은 세포외 또는 세포 표면 단백질이다. 기질에 따라서, MMP 에 의한 절단은 기질을 불활성화시키거나 또는 활성화시킨다(기질이 불활성 단백질 전구체인 경우). MMP가 기타 단백질을 활성화 및 불활성화할 수 있으므로, MMP 는 종종 세포외 신호전달, 세포외 매트릭스 리모델링 및 대사의 조절에 중요한 역할을 한다. 따라서 MMP 의 활성의 적절한 조절은 세포 및 조직의 정상적인 발생 및 유지에 중요한다.

[0004] MMP 활성이 잘못 조절되어 연결 조직의 과도한 분해되는 경우 다수의 병리학적 특징을 나타낼 수 있다. 상기 병리학적 상태는 일반적으로, 예를 들어 조직 붕괴 (tissue destruction), 섬유종 질환 (fibrotic disease), 병리학적 매트릭스약화, 결함 상처 수복 (defective injury repair), 심혈관계 질환, 호흡기 질환, 신장 질환, 간장 질환, 및 중추 신경계 질환이 포함된다. 상기 상태의 구체적인 예에는, 예를 들어, 류마티스 관절염, 골관절염, 화농성 관절염, 다발경화증, 욕창성 궤양, 각막 궤양, 표피 궤양 (epidermal ulceration), 소화관 궤양 (gastric ulceration), 종양 전이, 종양 침입, 종양 혈관형성, 치주 질환, 간 경화, 섬유성 폐질환 (fibrotic lung disease), 폐기종, 이 경화증 (otosclerosis), 죽상동맥경화, 단백뇨, 심근경색, 확장성 심근증 (dilated cardiomyopathy), 울혈성 심부전, 대동맥류, 수포성 표피박리증 (epidermolysisbullosa), 골 질환, 알츠하이머병, 결함 상처 수복 (예를 들어, 약한 수복 (weak repair), 협착증, 예컨대 수술후 협착증, 및 스케어링 (scarring)), 만성 폐쇄성 폐질환 및 관류후 심근 경색 (post myocardial infarction) 이 포함된다.

[0005] 한편, 콜라게나제는 이러한 MMP(Matrix metalloproteinase)의 일종에 해당되는 호중구 특이적 과립 내에 잠복형으로 저장되는 단백질 분해효소이다[Hasty, K, A., et al.,J. Biol. Chem.261:5645-5650(1986) and Hasty, K.A., et al., J. Biol Chem. 262:10048-10052(1987)]. 활성 형태의 콜라게나제는 포유동물에 있어 다양한 질병과 질환을 매개한다. 이들 질병 및 질환에는 골다공증 및 전이성 골수암과 같은 골 흡수병, 각막 궤양, 치주 질환, 염증성 관절 질환, 피부 염증성 질환과 창상, 및 화상이 포함되나 이에 제한되지 않는다[Harris, E.D., et al., NEJM 291:605-609(1074) and Harris, E.D., et al., NEJM 291:652-660(1974)].

[0006] 따라서 상기와 같은 특징을 갖는 콜라게나제(MMP-1)의 과도한 활성을 억제하는 물질을 이용하여, 콜라게나제 매개 질병 또는 질환을 치료하려는 시도가 계속적으로 이루어지고 있다. 뿐만 아니라, 이러한 콜라게나제는 일회의 UV 조사시에도 피부 내의 활성이 증가하여 콜라겐을 현저하게 감소시킬 수 있으므로, 콜라게나제는 광노화에 주요 인자로 보고되어 있으며, 이에 주름을 개선하기 위한 화장품 산업에서는 이러한 콜라게나제의 활성 억제에 초점을 맞추어 연구가 많이 진행되고 있는 실정이다.

[0007] 이와 관련하여, 한국공개특허 제1991-0016326호에서는 콜라게나제의 활성화를 저해하기 위한 테니댑(Tedidap)

및 그의 약학적으로 허용되는 염기 염의 용도를 개시하고 있으며, 한국공개특허 제2001-0031773호에서는 방향족 술폰 히드록삼산 메탈로프로테아제 억제제 및 이를 이용하여 병리학적인 MMP 활성 매개된 질병을 치료하는 방법을 개시하고 있고, 또한 한국공개특허 제1999-0040964호에서는 세틸피리디늄 클로라이드를 함유한 MMP 활성 억제용 약제 조성물 및 이를 이용하여 상처, 암전이, 류마토이드 관절염, 염증, 부갑상선항진증, 당뇨병, 각막궤양, 골다공증, 위궤양, 외상, 주름, 여드름, 에이즈, 화상, 치주질환, 동맥경화, 골절과 같은 질환을 예방하고 치료하는 방법에 대한 내용이 개시되어 있다.

[0008] 그러나 이러한 종래기술들은 합성 화합물을 이용하여 콜라게나제 또는 MMP 활성을 억제하는 조성물에 대한 것으로, 합성 화합물의 장기적인 사용 시 전신성 결합 조직 독성과 같은 부작용이 유발되는 문제점을 가지고 있다.

[0009] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 부작용이 없으면서 콜라게나제의 활성을 억제할 수 있는 물질을 찾고자 예의 노력한 결과, 굴(oyster) 가수분해산물에서 펩타이드를 분리한 후, 분석된 아미노산 서열을 바탕으로 합성 펩타이드를 제조하였으며, 이렇게 제조된 합성 펩타이드가 세포독성 없이 콜라게나제의 활성을 효과적으로 억제시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-1997-0009387호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 콜라게나제 활성을 효과적으로 억제할 수 있는 신규 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 신규 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 주름 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 콜라게나제 활성 억제용 펩타이드를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 콜라게나제 매개 질환은 골다공증, 전이성 골수암, 각막 궤양, 치주질환, 염증성 관절 질환, 피부 염증성 질환, 창상 및 화상으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 질환일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 상기 조성물에 대해 0.1ug/ml~5000mg/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 주름 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화장료 조성물을 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나로 제형화될 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 신규 펩타이드는 콜라게나제 활성을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 콜라게나제 매개 질환의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 주름 개선에 유용하게 사용할 수 있는바, 본 발명의 신규 펩타이드는 의약품 산업과 식품산업 및 화장품 산업과 같은 다양한 분야의 소재로서 폭넓게 사용될 수 있다. 특히 본 발명의 신규 펩타이드는 천연물로부터 유래된 펩타이드의 아미노산 서열에 바탕을 두고 있으며, 세포독성 없이 안정성을 가지므로, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 굴 가수분해물의 펩타이드 정제과정으로서 Q-Sepharose 크로마토그램, 크기배제 크로마토그램과 역상크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 신규 펩타이드(GPN, PGN)의 콜라게나제 활성 억제정도를 측정한 그래프이다.

도 3은 본 발명의 신규 펩타이드 PGN의 처리 후 시간 경과에 따른 콜라게나제의 잔여 활성을 측정한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 신규 펩타이드 PGN의 열안정성을 측정한 그래프이다.

도 5는 본 발명의 콜라게나제 활성을 50% 억제하는 데 필요한 신규 펩타이드 PGN의 농도를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 하나의 양태로서, 본 발명은 GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 콜라게나제 활성 억제용 펩타이드에 관한 것이다.

[0026] "콜라게나제는 MMP(Matrix metalloproteinase)의 일종에 해당되는 호중구 특이적 과립 내에 잠복형으로 저장되는 단백질 분해효소로서, 활성 형태의 콜라게나제는 포유동물에 있어 다양한 질병과 질환을 매개하는 것으로 알려져 있다.

[0027] 이들 질병 및 질환에는 골다공증 및 전이성 골수암과 같은 골 흡수병, 각막 궤양, 치주질환, 염증성 관절 질환, 피부 염증성 질환과 창상, 및 화상이 포함되나 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명에서는 굴(oyster)을 단백질 가수분해효소를 이용하여 가수분해하였으며, 이렇게 가수분해해서 얻은 가수분해산물을 여러 단계의 크로마토그래피를 통해 기능성 펩타이드를 정제하였고, 이들의 아미노산 서열을 바탕으로 제조한 합성 펩타이드(GPN 및 PGN)가 콜라게나제 활성을 효과적으로 억제하는 것을 최초로 규명하였다(도 6 참조). 또한, 상기 합성 펩타이드의 세포 독성 실험 결과 세포 내 독성이 없는 것을 확인하여 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 조성물로도 안정성 있게 사용 가능함을 확인하였다(도 5 및 표 4참조).

[0029] 본 발명의 신규 펩타이드는 굴(oyster)로부터 직접 분리하여 제조할 수 있다. 간략하게는 굴(oyster)을 Protamex 및 Neutrase를 이용하여 가수분해한 후, 가수분해물 중 ACE 저해능을 갖는 기능성 펩티드를 한외여과, 음이온 교환수지 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피로 정제하는 방법을 통해서 직접 분리할 수 있다(자세한 내용은 하기 실시예 참조).

[0030] 또한 본 발명의 신규 펩타이드는 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 화학적 합성(Creighton, Proteins; Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman and Co., NY, 1983)에 의해 제조될 수 있다. 대표적인 방법으로서 이들로 한정되는 것은 아니지만 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법이 포함된다 (Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, Williams et al., Eds., CRC Press, Boca Raton Florida, 1997; A Practical Approach, Atherton & Sheppard, Eds., IRL Press, Oxford, England, 1989).

[0031] 또한 본 발명의 신규 펩타이드는 유전공학적 방법에 의해 제조될 수 있다. 우선, 통상적인 방법에 따라 상기 펩타이드를 코딩하는 DNA 서열을 작제한다. DNA 서열은 적절한 프라이머를 사용하여 PCR 증폭함으로써 작제할 수

있다. 다른 방법으로 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예컨대, 자동 DNA 합성기(예를 들면, Biosearch 또는 Applied iosystems사에서 판매하는 것)를 사용하여 DNA 서열을 합성할 수도 있다. 제작된 DNA 서열은 이 DNA 서열에 작동가능하게 연결되어 그 DNA 서열의 발현을 조절하는 하나 또는 그 이상의 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 인핸서 등)을 포함하는 벡터에 삽입시키고, 이로부터 형성된 재조합 발현 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨다. 생성된 형질전환체를 상기 DNA 서열이 발현되도록 하기에 적절한 배지 및 조건 하에서 배양하여, 배양물로부터 상기 DNA 서열에 의해 코딩된 실질적으로 순수한 펩타이드를 회수한다. 상기 회수는 당업계에 공지된 방법(예컨대, 크로마토그래피)을 이용하여 수행할 수 있다. 상기에서 '실질적으로 순수한 펩타이드'라 함은 본 발명에 따른 펩타이드가 숙주로부터 유래된 어떠한 다른 단백질도 실질적으로 포함하지 않는 것을 의미한다. 본 발명의 펩타이드 합성을 위한 유전공학적 방법은 다음의 문헌을 참고할 수 있다: Maniatis et al., MolecularCloning; A laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, 1982; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ColdSpring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Edition; Gene Expression Technology, Method in Enzymology, Genetics and Molecular Biology, Method in Enzymology, Guthrie & Fink (eds.), Academic Press, San Diego, Calif, 1991; 및 Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:12073-12080, 1990.

[0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명의 조성물에 의해 예방 또는 치료되는 상기 콜라게나제 매개 질환은 골다공증, 전이성 골수암, 각막 궤양, 치주질환, 염증성 관절 질환, 피부 염증성 질환, 창상 또는 화상 등과 같은 질환일 수 있다.

[0034] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0035] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0036] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 신규 펩타이드(GPN, AFN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)는 상기 조성물에 대해 0.1ug/ml~50mg/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0038] 또 다른 양태에서, 본 발명은 신규 펩타이드(GPN, AFN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물일 수 있다.

[0039] 이러한 식품 조성물은 본 발명의 신규 펩타이드를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가로 함유할 수 있다.

[0040] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨,

소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0042] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드) 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0043] 본 발명의 유효성분인 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)는 천연물로부터 유래된 펩타이드의 아미노산 서열에 바탕을 두고 있으며, 세포독성 없이 안정성을 가지므로 콜라게나제 매개 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0044] 또 다른 양태에서, 본 발명은 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 유효성분으로 포함하는 콜라게나제 매개 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0045] 본 발명의 건강기능식품은 콜라게나제 매개 질환 개선을 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0046] 본 발명에서 건강기능식품이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0047] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0048] 상기 식품 첨가물 공전에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0049] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 신규 펩타이드(GPN, AFN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0050] 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분인 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 신규 펩타이드(GPN, AFN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0051] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 신규 펩타이드(GPN, AFN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0052] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 신규 펩타이드(GPN, AFN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0053] 본 발명의 신규 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 하기 실시예에서도 확인한 바와 같이 콜라게나제 활성을 유의적으로 억제시킬 수 있기 때문에, 콜라게나제 매개 질환 개선에 효과적이다.

[0054] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0055] 또 다른 양태에서, 본 발명은 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 신규 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0056] 또 다른 양태에서, 본 발명은 포유동물에게 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 투여하는 것을 포함하는 콜라게나제 매개 질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0057] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0058] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0059] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 신규 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0060] 또 다른 양태에서, 본 발명은 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 유효성분으로 포함하는 주름 개선용 화장료 조성물일 수 있다.

[0061] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 조성물은 상술한 본 발명의 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.

[0063] 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 립스틱, 메이컵 베이스, 파운데이션, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.

[0064] 한편, 본 발명에 따른 상기 화장료 조성물은 신규 펩타이드(GPN 및 PGN로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드)를 나노리포좀 내부에 함유시켜 안정화하여 제형화할 수도 있다. 상기 신규 펩타이드를 나노리포좀 내부에 함유시키면, 펩타이드의 성분이 안정화되어 제형화시 침전형성, 변형 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 성분의 용해도 및 경피흡수율을 높일 수 있어 상기 추출물로부터 기대되는 효능을 최대로 발현시킬 수 있다.

[0065] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0066] **<실시예 1>**

[0067] **굴(oyster)로부터 가수분해물 제조**

[0068] 본 발명의 굴 유래 기능성 펩타이드를 동정하기 위하여, 먼저 냉동굴을 끓는 물에 3분간 찐 후, 미트그라인더(meat grinder: M-12S, Hankook Fujee Inc, Korea)를 이용하여 마쇄하고, 굴 무게의 4배 양에 해당하는 1.5%(w/v) 염화나트륨 용액을 첨가하여 10,000rpm(T-25 Basic, Ika Works, NC)에서 균질화하였다. pH는 1M NaOH를 이용하여 pH 6.5 내지 6.7로 조정하였다. 이 후 0.1%(w/v) 트랜스글루타미네이즈(transglutaminase)를 첨가한 다음 30℃에서 1시간 동안 반응시켰으며, 여기에 순차적으로 1%(w/v)의 Protamex 및 1%(w/v)의 Neutrase를 첨가한 후 40℃에서 1시간 동안 가수분해한 후, 가수분해 효소의 활성을 제거하기 위해 100℃에서 1시간 동안 가열하였다. 상기 과정을 통해 얻은 가수분해물은 8,000xg에서 25분간 원심분리(Supra 22K, Hanil Sci. Inc, Korea)하여 불용성 물질을 제거하고, 상등액은 회수하였다. 상등액은 전기투석을 통해 탈염하고, 10kDa의 멤브레인으로 한외 여과한 다음, 감압 하에 동결건조하여 기능성 펩티드 정제를 위한 시료로 사용하였다.

[0069] **<실시예 2>**

[0070] **콜라게나제 저해 펩티드의 정제**

[0071] 상기 실시예 1을 통해 수득한 굴 가수분해산물 중 콜라게나아제 저해능을 갖는 기능성 펩티드를 음이온 교환수지 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피 및 역상 크로마토그래피로 정제하였다.

[0072] <2-1> MMP 저해능의 측정

[0073] SensoLyte Generic MMP assay kit를 사용하여 측정하였다. 콜라게나아제 활성은 Worthingtom manual(Worthington Biochmical Co., 1988)에 따라 측정하였다. Assay kit에 의한 MMP 형태에 따른 저해활성은 표 1과 같다.

[0074]

표 1

[0075] 1 mg/mL 농도에서 MMP 형태에 따른 GPN과 PGN의 저해활성(%)

MMP type	GPN	PGN
mmp-1	30.69±7.26	10.87±2.28
mmp-2	79.57±3.04	59.03±3.81
mmp-9	34.35±2.45	non-detection

[0076] <2-2> 콜라게나아제 저해 펩타이드의 정제

[0077] 콜라게나아제 저해능을 가진 펩타이드 정제를 위한 칼럼 크로마토그래피의 조건은 하기 표 2과 같다. 즉 콜라게나아제 저해 펩타이드를 정제하기 위해 실시예 1을 통해 제조한 시료 0.5 g을 12 mL의 20 mM Tris-Cl (pH 8.0)에 용해시키고 HiLoad 16/10 Q-Sepharose 칼럼(16x100 mm)에 5 mL를 주입하였다. 1 mL/min의 유속에서 1 칼럼 부피의 20 mM Tris-Cl(pH 7.5)로 비결합 물질을 세척한 후 100 mL의 0.75 M NaCl을 포함하는 20 mM Tris-Cl(pH 7.5)으로 선형 균배하여 수지에 결합한 물질을 용출하였다. 펩타이드는 226 nm에서 검출하였고, 2 mL를 분획하였다.

[0078] 그 결과 콜라게나제저해활성을 보이는 한 개의 분리 peak를 얻었다. 이를 Micro-Centrivac(NB-503CIR, N-Biotech Inc., Seoul, Korea)에서 농축한 후 Superdex peptide 칼럼(10x300 mm)에 200 uL를 injection하여 분자량 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다.

[0079] 그 결과 첫 번째 피크에서 콜라게나제 저해활성을 보였으며, 이를 Source 5 RPC ST 칼럼(4.6x150 mm)에서 0.09% TFA를 포함한 60% 아세토니트릴 용매로 균배용출하여 최종적으로 3-1-1의 분획을 수득하였다.

표 2

[0080] 바이오기능성 펩티드의 정제를 위한 컬럼 크로마토그래피의 조건

Chromatography	Column	Solvent	Flow rate	Detection
Anion-exchange	HiLoad Q-Sepharose (16x600 mm)	A: 20 mM Tris-Cl, pH 8.0 B: 20% CH3CN in 0.1%TFA	1 mL/min	226 nm
Size exclusion	Superdex peptide (10x300 mm)	A: 20 mM Tris-Cl, pH 7.5	0.5 mL/min	216 nm, 254 nm
Reversed phase	Source 5RPC ST (4.6x150 mm)	A: 0.1% TFA/water B: 0.1% TFA/60% ACN	1 mL/min	216 nm 254 nm

표 3

[0081] 정제 단계별 수득한 분획들의 콜라게나제 억제능(%)

Purification step	Pooled name	Fraction number	Collagenase inhibition, %	Suggested peptide
Q-Sepharose ion exchange chromatopgraphy	3	30,31	6.7	-
Superdex peptide size exclusion chromatography	3-1	20	18.3	
Source 5RPC ST reversed-phase chromatography	3-1-1	18,19	35.2	PGN, GPN

[0082] **<실시예 3>**

[0083] **정제 펩타이드의 분자량 분포와 아미노산 서열 분석**

[0084] 기능성 펩타이드의 아미산 서열을 결정하기 위해 상기 실시예 2의 역상 크로마토그래피로 얻은 분획물을 Micro-Centvac에서 완전히 건조시켰다. 건조한 시료를 20 uL의 0.1% TFA를 포함한 증류수에 용해시키고 시료 중의 염을 제거하기 위해 50% 아세토니트릴로 활성화시켜 0.1% TFA를 포함하는 증류수로 평행시킨 ZipTip C18(Pierce #87782)에 로딩하였다. 0.1% TFA를 포함하는 증류수로 2-3회 세척하고 ZipTip C18에 결합된 펩타이드를 0.1% TFA를 포함하는 70% 아세토니트릴 용액을 용출하였다. 용출한 펩타이드 용액을 biobrene(AB Systems Co., U.S.A.)이 전처리된 마이크로필터에 10 uL를 로딩하고 아르곤 가스로 건조시켰다. 건조가 끝난 필터를 카트리지에 장착하여 아미노산 자동 서열기(ABI492 automated protein sequencer, Applied Biosystem, Foster, CA, U.S.A.)의 pulsed-liquid 법을 통해 아미노산 서열을 결정하였다. 그리고 전기분무 이온화(ESI)법을 이용하여 질량분석기로 분자량 이온 및 분해된 이온을 검출하여 정제된 펩타이드 분자량을 확인하였다. 질량스펙트럼은 Q-TOF2(Micromass, U.K.) 질량분석기에 Nano-ESI interface를 이용하여 data dependant MS/MS 방법으로 얻었다.

[0085] 그 결과 ACE 저해 펩타이드의 정제물은 모두 500 Da 미만의 분자량에서 CHCA matrix와 차이를 보이는 주요 피크를 확인하였고, 2개의 펩타이드의 아미노산 결합서열을 확인하였다(하기 표 4 참조). 확인한 아미노산 서열 PGN 및 GPN이 가수분해물에서 새로이 확인하였고, GPN과 PGN의 콜라게나제 저해활성은 각각 0.43 mg/ml와 0.60 mg/ml의 농도에서 58.1%와 100%였다.

[0086] **<실시예 4>**

[0087] **본 발명의 기능성 펩타이드 합성 및 합성된 펩타이드의 정제**

[0088] 앞서 수행한 실험을 통해 콜라게나제 저해 활성을 갖는 펩타이드의 서열을 확인하고, 이러한 펩타이드의 또 다른 기능을 확인하기 위해 펩타이드를 합성하였다.

[0089] 펩타이드는 ASP48S(Peptron Inc., Dajeon, Korea)를 이용하여 Fmoc 고상 펩타이드 합성을 수행하고 Vydac Everest C18 칼럼(22x250 mm, 10 um)를 사용하여 역상 HPLC로 정제하였다. 즉 펩타이드의 C-말단에 첫 번째 아

미노산이 수지에 부착된 것을 사용하여 Na-말단이 Fmoc로 보호된 아미노산을 순서에 따라 부착하였으며 잔기는 TFA에서 제거되는 보호기를 사용하였다. coupling 시약으로 HBTU/HOBt/NMM을 사용하였으며, Fmoc의 제거는 20% piperidine/DMF를 사용하였다. 합성 펩타이드를 수지에서 분리하고 잔기의 보호기 제거를 위해 TFA/EDT/thioanisole/TIS/H2O(90/2.5/2.5/2.5/2.5, v/v)를 사용하였다. 펩타이드는 0.1% TFA를 포함하는 40% 아세토니트릴 용액으로 선형 균배하여 용출하였다. 정제한 펩타이드의 분자량은 LC/MS (Agilent HP1100 시리즈)로 확정하였다.

[0090] 그 결과 합성한 펩타이드들은 HPLC에서 단일의 peak를 나타내었으며, 합성 펩타이드는 MALDI-TOF 질량 분석기에서 단일 peak의 분자량을 나타내고 있었다. 본 발명에서는 상기와 같이 기능성을 갖는 2개의 합성 펩타이드를 하기 표 3에 나타내었다.

표 4

[0091] 본 발명의 기능성 펩타이드

순번	합성 펩타이드
1	GPN
2	PGN

[0092] **<실험예 1>**

[0093] **본 발명의 기능성 펩타이드의 세포독성 측정**

[0094] 본 실험에서는 상기 실시예 4를 통해 합성된 기능성 펩타이드의 세포독성을 평가하였다(표 5 참조).

[0095] 세포독성은 정상 간세포인 Chang cell로 확인하였다. 즉 세포 배양용 플라스크에 배양한 Chang cell을 10% FBS가 함유된 MEM 배지로 배양하였다. $1x10^4$ cells/well의 농도로 96 웰 플레이트에 분주하고, 24시간 동안 35℃, 습도 95%, CO2, 5%로 조절된 CO_2배양기에서 배양하였다. 새로운 배지에 시료를 최종 농도가 50, 100, 200 및 300 ug/mL이 되도록 녹여 세포주에 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포 증식률은 모두 Promega사에서 구입한 CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay를 이용하여 microplate reader(Perkin Elmer 1420, VICTORTM X Multilabel Plate Readers, Waltham, MA, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

표 5

[0096] 본 발명의 기능성 합성 펩타이드의 세포 독성

합성 펩타이드	Cell viability, %
GPN	108.3±1.0
PGN	103.9±6.2

[0097] 그 결과 상기 표 5에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 기능성 합성 펩타이드는 정상 간세포에 대하여 세포 독성을 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이를 통해 본 발명의 기능성 펩타이드는 세포에 유해작용 없이 안전하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0098] **<실험예 2>**

[0099] **본 발명의 기능성 펩타이드의 콜라게나제 활성 저해능의 측정**

[0100] 본 실험에서는 상기 실시예 4를 통해 합성된 기능성 펩타이드의 콜라게나제 활성 저해능의 측정하였다.

[0101] 콜라게나제(collagenase) 활성 저해능은 Invitrogen사의 EnzChekGelatinase/Collagenase Assay Kit-250-2000 Assays 시약을 구입하여 사용하였다. 먼저 1 mg DG gelatin vial에 1.0 mL의 DDW를 가해 DG gelatin stock solution(1 mg/mL)을 만든 후, 10 x reaction buffer 2 mL에 DDW 18 mL를 가해 reaction buffer를 희석하였다. 다음으로 콜라게나제 효소 시약을 제조하였다. Working solution으로 최종 농도가 0.2 unit/mL이 되도록 reaction buffer로 희석하였다. 실험에 사용할 시료는 농도가 0.01, 0.1 1, 10 mg/mL가 되도록 제조하여, 시료

를 96 웰 플레이트에 20 uL씩 triple로 준비하였다. DQ gellatin 10 uL와 sample blank에는 reaction buffer 100 uL, 샘플에는 working solution 100 uL를 시료에 가하고, 빛을 차단한 상태로 실온에서 1-2시간 동안 방치한 후 형광 강도 excition wavelength 495 nm 및 emission wavelength 515 nm에서 ELAZA plate reader(SpectraMax M2 & M2e Multi-Mode Microplate Reader. Molecular Devices Corporation. USA)로 형광강도를 측정하였다.

[0102] 그리고 bovine achilles tendon을 기질로 사용한 콜라게나제 활성은 Worthington enzyme manual(1972)에 따라 측정하였다. 즉 capped test tube에 기질인 collagen(Sigma C9879)의 무게를 정확히 달고, 2.0 mL의 0.36 mM CaCl2를 포함하는 50 mM TES 완충액(pH 7.5)과 collagenase(0.2 mg/mL, Sigma C0130) 0.1 mL를 가하여 37℃의 항온조에서 흔들어 주면서 5시간 가수분해하였다. 1 mL의 2% ninhydrin 용액이 들어있는 capped test tube에 가수분해물 0.2 mL를 가하여 반응을 중지시키고, 100℃의 건조기에서 20분 동안 발색 시킨 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유리된 아미노산의 함량은 L-leucine으로 작성한 표준곡선에 따라 정량하였으며 콜라게나제 활성은 uM leucine/hr/g-collagen으로 표시하였다. 한편 합성 펩타이드에 의한 콜라게나제의 저해는 합성 펩타이드와 콜라게나제의 비가 각각 8.3배와 12.5배가 되도록 혼합한 후 저온고에서 15시간 충준히 반응 시킨 후, 콜라게나제 활성 측정방법에 따라 측정하였으며, 잔여활성은 저해제 첨가 유무에 따른 활성의 비로 계산하여 잔여활성의 %로 표시하였다.

[0103] 그 결과 도 6에 나타낸 바와 같이, 합성 펩타이드 중 GPN 및 PGN은 콜라게나제에 대하여 농도 의존적인 저해활성을 보였다. 그리고 콜라게나제의 기질로 bovine achilles tendon을 사용하여 효소 대 합성 펩타이드의 저해활성을 측정한 결과, 도 7에서 나타낸 바와 같이, GPN과 PGN은 콜라게나제 활성의 58..1%와 100%를 억제하여 제해효과를 보였다.

[0104] **<실험예 3>**

[0105] **본 발명의 기능성 펩타이드 PGN의 콜라게나제 활성 저해능**

[0106] <3-1> 콜라게나제에 PNG 처리에 따른 시간경과별 효소 잔존 활성

[0107] 본 발명의 기능성 펩타이드인 PGN의 콜라게나제 활성 저해능을 측정하기 위하여 콜라게나제에 PNG를 처리한 후 시간경과에 따른 효소 잔존 활성을 측정하였다.

[0108] 시판 콜라게나제와 본 발명의 합성 펩타이드 PNG를 혼합하여 37℃에서 10분 단위로 60분까지 반응시켜 콜라게나제의 활성을 저해시킨 후, 송아지 아킬레스 건을 기질로 콜라게나제 활성을 측정하였다.

[0109] 그 결과 도 8에서 나타낸 바와 같이, 시판 콜라게나아제는 항온시간의 증가와 더불어 활성이 급속히 감소하였으며, 저해제로서 PNG를 첨가한 경우는 항온 시간에 상관없이 콜라게나아제 활성을 저해하여 잔여 활성은 거의 나타나지 않았다.

[0110] <3-2> 콜라게나제에 PNG 처리에 따른 시간경과별 효소 억제능 변화

[0111] 본 발명의 기능성 펩타이드인 PGN의 콜라게나제 활성 저해능을 측정하기 위하여 콜라게나제에 PNG를 처리한 후 시간 경과에 따른 효소 억제 활성을 상기 <3-1>과 동일한 방법으로 측정하였다.

[0112] 그 결과 도 9에서 나타낸 바와 같이, 콜라게나제에 본 발명의 PNG 펩타이드를 처리한 후 37℃에서 전배양하는 동안 콜라게나제의 억제 활성이 85% 이상 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 1시간이 경과한 시점에도 90% 이상인 것으로 나타났다.

[0113] <3-3> 본 발명의 PNG 펩타이드의 IC_{50} 값

[0114] 본 발명의 기능성 펩타이드인 PGN의 콜라게나제 활성 저해능을 측정하기 위하여 콜라게나제에 PNG를 농도별 처리에 따른 콜라게나제 억제 활성을 측정하였다.

[0115] 그 결과 도 10에서 나타낸 바와 같이, 콜라게나제에 본 발명의 PNG 펩타이드를 농도별로 처리한 경우 콜라게나

제 억제 활성이 농도에 의존하여 증대되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 본 발명의 PNG 펩타이드의 IC_{50} 값이 8.29ug으로 나타나 매우 높은 콜라게나제 억제 활성을 보여주었다.

[0116] **<실험예 4>**

[0117] **본 발명의 기능성 펩타이드의 피부재생(주름개선) 효과**

[0118] **<4-1> CCD 989sk cell 배양 및 시료 추출**

[0119] 본 발명의 기능성 펩타이드의 주름 개선 효과를 실험하기 위해 섬유아세포주인 CCD 986sk cell을 세포 배양용 플라스크에 배양한 CCD 986sk cell을 10ml 피펫으로 세포를 플라스크에서 떼어내어 계대하였고, 세포는 10% FBS가 함유된 IMDM 배지로 배양하였다. CCD 986sk cell를 $2.5x10^4$ cells/well의 농도로 96 well plate에 분주하고, 24시간 동안 35℃, 습도 95%, CO_2 5%로 조절된 CO_2 배양기에서 배양하였다. 새로운 배지에 상기 시료를 최종 농도가 1, 10ug/ml가 되도록 녹여 세포에 처리하여 24시간 배양 후, 상등액을 모아 시료로 사용하였다.

[0120] **<4-2> MMP-1 저해활성의 측정**

[0121] MMP-1은 SensoLyte 490 MMP-1 Assay Kit(AnaSpec, MI, USA)를 구입하여 측정하였다. 시료를 처리하여 배양한 CCD 986sk의 배양 상등액 50ul에 MMP-1기질을 50ul가하여 30초간 교반 후 microplate reader(Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 흡수파장 340nm, 방출파장 490nm에서 10분 간격으로 60분 동안 형광값을 측정하여, 하기의 식으로 저해 활성을 측정하였다.

[0122] MMP-1 저해활성 = [1-(S-B)/(C-B)] X 10

[0123] S : 시료의 흡광도, B : 공시험군의 흡관도, C : 대조군의 흡광도

[0124] MMP-1 활성 저해능 평가 결과 굴 유래 펩타이드인 PGN과 GPN은 시료 10ug/ml의 농도에서 MMP-1의 활성이 하기 표 6과 같이 53.9%와 41.4%로 높은 저해 활성을 보여주었다.

표 6

[0125] MMP-1 활성 측정 결과

Peptides(/)		MMP-1 inhibition activity(%)
PGN	1	29.1±17.5*
	10	53.9±7.6*
GPN	1	53.9±7.6*
	10	41.4±7.8*

[0126] *p<0.05: compared with control group

[0127] **<4-3> Procollagen 생성량 측정**

[0128] 본 발명의 기능성 펩타이드인 GPN 및 PGN의 피부재생 효과를 측정하기 위하여 procollagen 생성량을 측정하였다. Procollagen은 type 1 C-peptide(PIP) EIA kit를 이용하여 측정하였다. CCD 986sk의 상등액 10 ul에 시료 희석제 40 ul를 넣어 5배 희석하여 시료액으로 사용하였다. 코팅된 microplate에 antibody-POD conjugate 100 ul를 넣고 희석된 시료액 20 ul를 가하여 뚜껑을 덮고 호일로 싼 후, 37℃에서 3시간 동안 배양한다. 배양한 후 모든 액을 제거하고 PBS를 400 ul씩 넣어 4번 세척후 물기를 완전히 제거하고 기질용액으로 TMBZ를 100 ul 넣고 실온에서 15분 동안 방치한다. 정지용액으로서 1 normal 황산 용액 100 ul를 넣고 반응을

중지시킨 다음 microplate reader(Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 용액의 농도는 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 및 640 ng/ml를 사용하였다. 피부재생 효과는 표 7와 같다.

표 7

[0129] CCD 986sk 피부 fibroblast 세포배양에 의한 본 발명의 기능성 합성 펩타이드의 피부 재생효과

펩타이드	농도 (mg/ml)	세포재생효과(%)	
		1일	3일
GPN	0.01	226.1±8.4	259.6±12.9
	0.1	209.8±12.7	250.0±9.3
	1	222.6±9.7	245.7±14.8
	10	233.2±12.7	221.9±27.9
PGN	0.01	177.3±8.2	246.0±1.2
	0.1	153.2±7.0	191.5±19.5
	1	208.5±3.8	228.8±12.0
	10	230.8±9.0	210.1±12.8
대조군		100.0±5.6	100.0±7.7

[0130] **<실험예 5> 피부섬유아세포(CCD 986sk)를 통한 피부세포 재생능 측정**

[0131] **<5-1> 세포의 배양**

[0132] 세포 증식능에 사용한 CCD 986sk cell은 American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA)에서 분양받아 사용하였다. 세포 배양용 플라스크에 배양한 CCD 986sk cell을 10 mL 피펫으로 세포를 플라스크에서 떼어내어 계대하였고, 세포는 12% FBS(Lonza, Valais, Switzerland)가 함유된 Iscove's Modified Dulbeccos Medium(IMDM, Lonza, Valais, Switzerland)배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 이때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생제(Penicillin streptomycin, Gibco, CA, USA)를 사용하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA(PBS-EDTA)로 세척한 후 트립신 처리하여 계대 배양하였으며, 배지는 48시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

[0133] **<5-2> 세포 증식능**

[0134] 세포증식능을 확인하기 위하여 CCD 986sk cell을 96 well plate에 10% FBS가 함유된 IMDM배지에 $2.5x10^4$ cells/well의 농도로 100ul씩 분주하고 24시간 동안 안정화시켰다. 새로운 배지에 시료를 최종 농도가 0.01, 0.1, 1 및 10 ug/ml이 되도록 배지에 녹여 세포주에 처리한 후 일정기간 동안 배양하였다. 세포주의 생존률을 측정하기 위해 MTS 시약을 이용하여 microplate reader(Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

[0135] 그 결과 피부 섬유 아세포인 CCD 986sk를 사용하여 펩타이드 YAK의 세포 재생능을 알아본 결과 하기 표 8과 같이 1일 배양시 농도에 따라 세포의 증식이 증가함을 알 수 있었고, 3일 배양시에는 모든 농도에서 70%에 가까운 세포 증식능을 확인할 수 있었다.

표 8

[0136] 세포 재생능 측정 결과

Peptides (ug/ml)	Cell proliferating activity (%)
	1 day
control	100.0±5.6

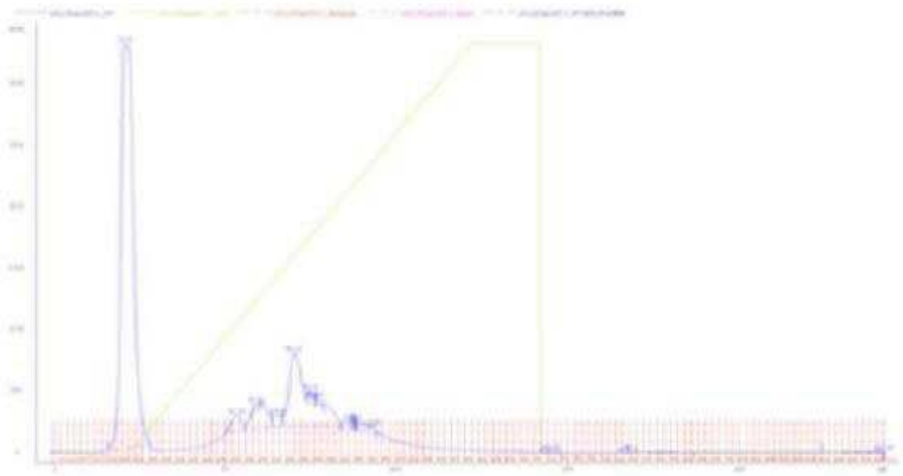
PGN	0.01	135.2±4.9*
	0.1	124.2±4.0*
	1	149.4±2.4*
	10	159.6±5.9*
GPN	0.01	150.1±0.5*
	0.1	142.5±12.6*
	1	155.8±6.2*
	10	160.7±8.4*

[0137] *p<0.05: compared with control group

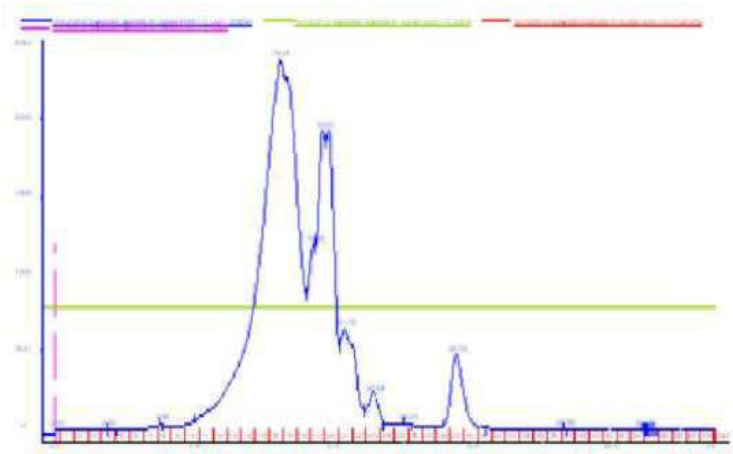
[0138] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특히 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

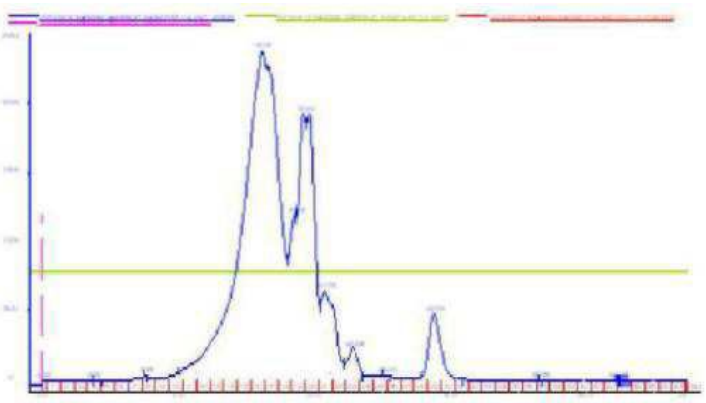
도면1



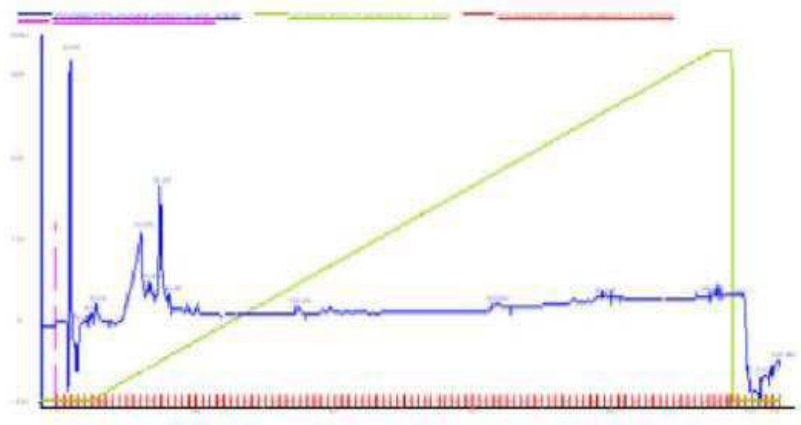
도면2



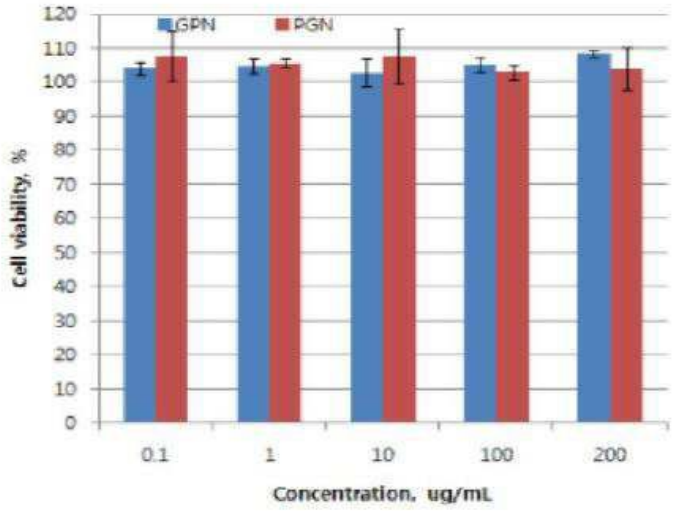
도면3



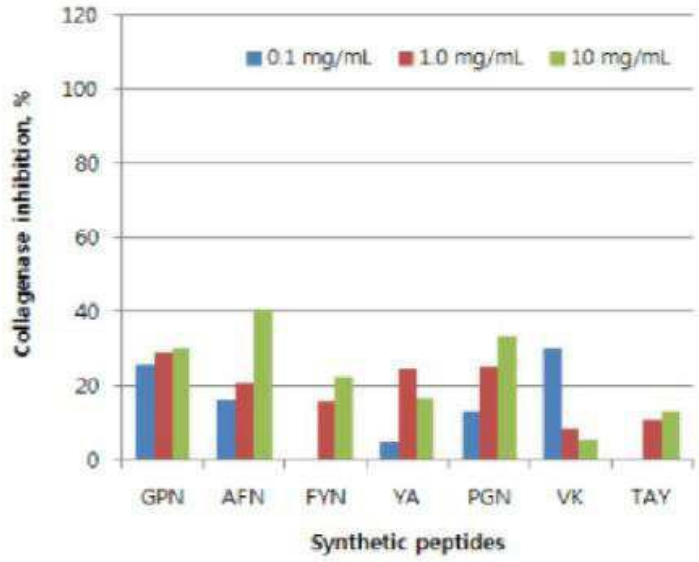
도면4



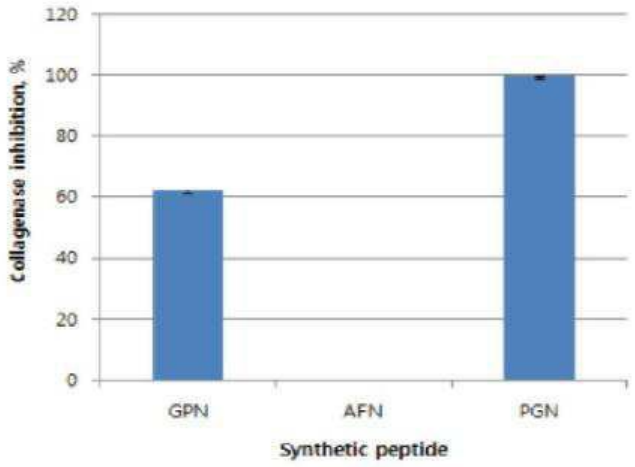
도면5


GPN
PGN
Cell viability, %
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
1
10
100
200
Concentration, ug/mL

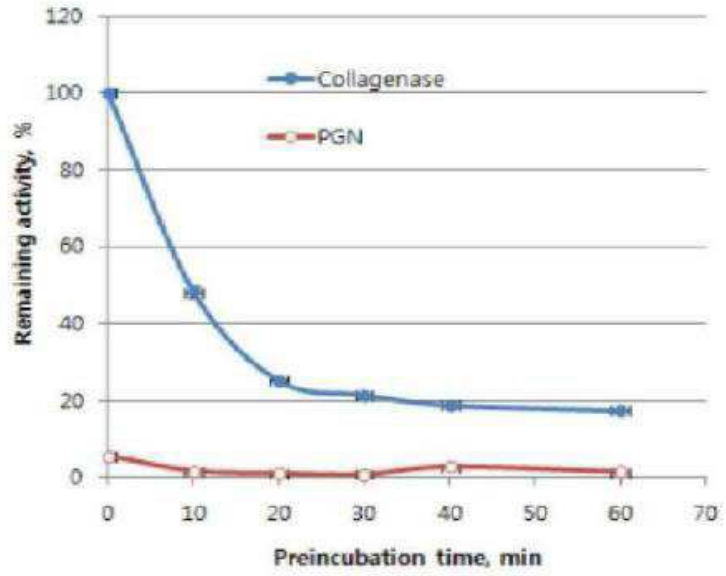
도면6


120
100
80
60
40
20
0
0.1 mg/mL
1.0 mg/mL
10 mg/mL
Collagenase inhibition, %
GPN
AFN
FYN
YA
PGN
VK
TAY
Synthetic peptides

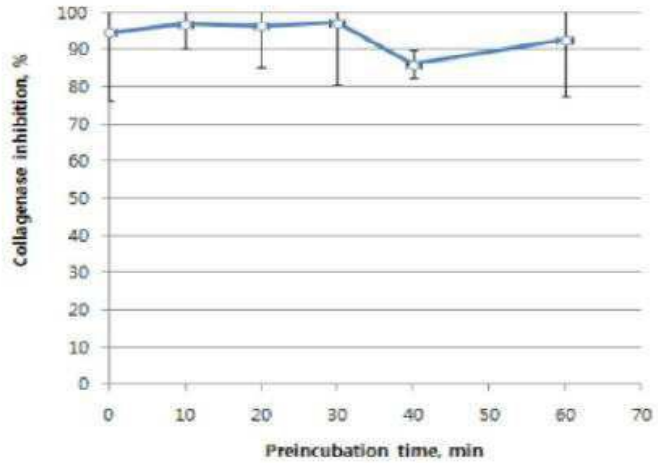
도면7


120
100
80
60
40
20
0
Collagenase inhibition, %
GPN
AFN
PGN
Synthetic peptide

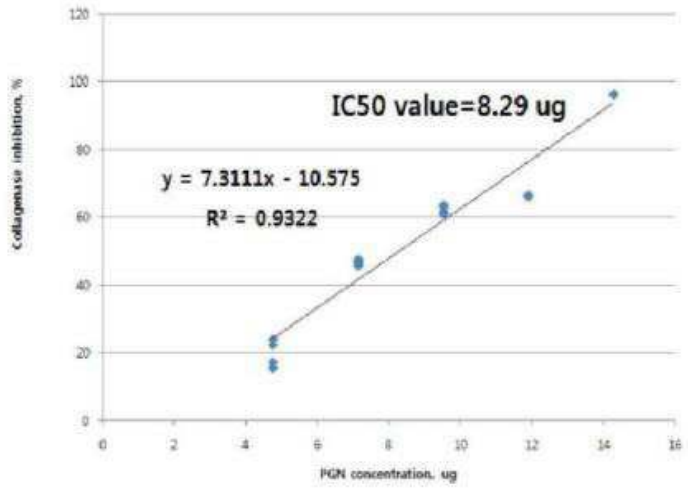
도면8


Collagenase
PGN
Remaining activity, %
Preincubation time, min

도면9


Collagenase inhibition, %
Preincubation time, min

도면10


IC50 value=8.29 ug
y = 7.3111x - 10.575
R² = 0.9322
Collagenase inhibition, %
PGN concentration, ug